



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/35963</p> <p>(43) 国際公開日 1997年10月2日(02.10.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00982</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月24日(24.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/72914 1996年3月27日(27.03.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大日本製薬株式会社 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 野村明徳(NOMURA, Akinori)(JP/JP) 〒651-12 兵庫県神戸市北区花山東町1番3-402 Hyogo, (JP) 川島 和(KAWASHIMA, Hitoshi)(JP/JP) 〒534 大阪府大阪市都島区友通町1丁目5番10-708 Osaka, (JP) 矢野かおり(YANO, Kaori)(JP/JP) 〒560 大阪府豊中市東泉丘1丁目30番2-509 Osaka, (JP) 藤井香織(FUJII, Kaori)(JP/JP) 〒532 大阪府大阪市淀川区宮原1丁目17番26-905号 Osaka, (JP)</p>		<p>古谷泰治(FURUTANI, Yasuji)(JP/JP) 〒655 兵庫県神戸市垂水区五色山8丁目3番43-601号 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL BETA-2 ADRENERGIC RECEPTOR SUBTYPE AND USE THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 新規β<sub>2</sub>-アドレナリン受容体サブタイプおよびその用途</p> <p>(57) Abstract A novel beta-2 adrenergic receptor subtype; a DNA coding for the same; a recombinant vector having said DNA; a host cell transformed by said vector; a process for producing said beta-2 adrenergic receptor subtype by culturing said host cell; a method and kit for screening agonists and/or antagonists of said beta-2 adrenergic receptor subtype; and a method of assaying the expression of said beta-2 adrenergic receptor subtype in the cells or tissues. The method of screening agonists of the novel beta-2 adrenergic receptor subtype is useful for the development of remedies for a certain type of asthmatic disease. Recombinant animals genetically engineered with the DNA coding for the beta-2 adrenergic receptor subtype provide useful means for studying the relationship between beta-2 adrenergic receptors and asthmatic diseases.</p>		

(57) 要約

新規 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプ、それをコードするDNA、該DNAを有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞の培養による当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプの製法、当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング法およびそのためのキット、細胞または組織での当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプの発現の検定法。

本発明の新規 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストのスクリーニング法は、ある種の喘息疾患のための治療剤の開発に有用である。また、当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのDNAを用いて遺伝子操作した組換え動物は、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体と喘息疾患との関連の研究のための有効な手段を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	RD	ルドウィグ
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GG	ガイアナ	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HE	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
BS	バハマ	IT	イタリア	MR	モロッコ	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CC	中東アフリカ共和国	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	KR	大韓民国	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CI	コート・ジボワール	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CN	中国	LI	リビア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CC	ココ共和国			PT	ポルトガル		
CD	コンゴ民主共和国			RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						

## 明細書

新規  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプおよびその用途

## 技術分野

本発明は、新規  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプ、それをコードする DNA、該 DNA を含む組み換えベクターおよび該組み換えベクターにより形質転換された宿主細胞、並びにそれらの用途に関する。

## 発明の背景

ヒト  $\beta$  アドレナリン受容体には、現在  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  および  $\beta_3$  の 3 種のサブタイプの存在が知られている。これらのうち、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体（以下、 $\beta_2$ -AR と略称する）は主に気管、子宮および血管の平滑筋に存在し、筋弛緩作用を有する。このため、 $\beta_2$ -AR 作動薬は気管支喘息の治療剤として使用されている。また、筋収縮性および筋弛緩性アドレナリン受容体のインバランスが気管支喘息の病因の 1 つではないかとの仮説が提出されている。

一方、ヒト  $\beta_2$ -AR の cDNA は既にクローニングされており、その塩基配列およびタンパク質のアミノ酸配列も決定されている [Kobilka ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 46-50 (1987); 配列表配列番号 3]。最近、喘息患者と健常者の  $\beta_2$ -AR の DNA 解析により、該遺伝子の多型（ポリモルフィズム）と喘息疾患との因果関係が調べられ、喘息患者に限らず健常者にも高頻度に  $\beta_2$ -AR の多型が見られることが明らかとなった [Reihnsaus ら, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 8: 334-339 (1993)]。しかしながら、既知の  $\beta_2$ -AR 遺伝子またはその多型とは別個の  $\beta_2$ -AR サブタイプ遺伝子の存在およびその発現については全く未知であった。

## 発明の開示

本発明の目的は、既知のヒト  $\beta_2$ -AR とは異なるアミノ酸配列を有する新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを提供することである。また本発明の別の目的は、該新規  $\beta_2$ -AR サブタイプもしくはそれを発現する形質転換細胞を用いた該  $\beta_2$ -AR サブタイプのアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング法並びにそのた

めのキットを提供することである。本発明のさらに別の目的は、該新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ遺伝子の一部または全部を検出することによる該 $\beta_2$ -ARサブタイプの発現の検定法を提供することである。

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒト類表皮癌細胞A 4 3 1細胞株〔大日本製薬（株）製、カタログ番号：0 9 - 1 5 5 5；以下、単にA 4 3 1細胞と略称する〕およびヒト心臓組織において、既知の $\beta_2$ -AR mRNAの他に、既知の $\beta_2$ -ARと相同性は高いが明らかに異なる新規mRNAが発現していることを初めて見出し、さらに、そのcDNAをクローニングして塩基配列およびそれがコードするタンパク質のアミノ酸配列を決定した。本発明者らは、さらに、該新規cDNAにコードされるタンパク質が $\beta_2$ -ARの生理機能を有することを見出し、該タンパク質を新規 $\beta_2$ -ARサブタイプであると同定した。また、新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAを含有する組換えベクターで形質転換した動物細胞を用いた、当該 $\beta_2$ -ARサブタイプのアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング法を確立した。さらに、該新規 $\beta_2$ -ARサブタイプmRNAの一部をRT-PCR法にて増幅し、得られたcDNA断片を検出することによる当該 $\beta_2$ -ARサブタイプの発現の検定法を開発して本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下に述べるものである。

(1) [ $^{125}$ I]シアノピンドロールに対するK<sub>d</sub>値が約75 pMであり、且つ、実質的に配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ、特にヒト由来である新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ、就中A 4 3 1細胞またはヒト心臓で発現する新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ。

(2) 上記 $\beta_2$ -ARをコードする塩基配列を有するDNA、好ましくは配列表配列番号2に示される塩基配列中、少なくとも塩基番号101乃至1345で示される塩基配列を有する上記DNA。

(3) 上記DNAを含有する組換えベクターおよび該組換えベクターで形質転換された宿主細胞、特に動物細胞、就中チャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）

細胞。

(4) 上記形質転換細胞を培養して得られる培養物から新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを採取することを特徴とする上記新規  $\beta_2$ -AR サブタイプの製造方法。

(5) 上記新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを用いた当該受容体のアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング法、特に該新規  $\beta_2$ -AR が上記形質転換細胞の形態で用いられる上記スクリーニング法。

(6) 上記新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを含む当該受容体のアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング用キット、特に該新規  $\beta_2$ -AR サブタイプが上記形質転換細胞の形態で用いられる上記スクリーニング用キット。また、さらに標識リガンドを含む試薬および cAMP 定量用試薬を含む上記スクリーニング用キット。

(7) 上記新規  $\beta_2$ -AR サブタイプの DNA の一部または全部を検出することを特徴とする当該新規  $\beta_2$ -AR サブタイプの発現の検定法。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、A 4 3 1 細胞由来の全 RNA からの新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプの cDNA クローン化の工程を表す図である。

図 2 は、A 4 3 1 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA の塩基配列 (5' 末端より 700 塩基まで) および当該  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列 (1~200 位のアミノ酸) を示す図である。塩基配列の上段に、既知のヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA の塩基配列の中で新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA の塩基配列とは異なる塩基を、アミノ酸配列の下段に、既知のヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列の中で新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸をそれぞれ示している。

図 3 は、A 4 3 1 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA の塩基配列 (701 番目の塩基から 3' 末端まで) および当該  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列 (201~415 位のアミノ酸) を示す図である。塩基配列の上段に、既知のヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA の塩基配列の中で新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタ

イプ cDNA の塩基配列とは異なる塩基を、アミノ酸配列の下段に、既知のヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列の中で新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプとは異なるアミノ酸をそれぞれ示している。また、「...」印の部分は対応する塩基が存在しないことを意味する。

図 4 は、動物細胞用発現ベクター pKCN1 の構築図である。

図 5 は、A431 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ cDNA を含有する動物細胞用発現プラスミド pKREX20 の構築図である。

図 6 は、CHO/pKREX20 細胞で発現する A431 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプに対するリガンド結合試験の結果を示すグラフである。

図 7 は、CHO/pKREX20 細胞で発現する A431 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプに対するリガンド結合試験の結果に基づくスキャッチャードプロットである。

図 8 は、A431 細胞由来の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプを発現する CHO/pKREX20 細胞における cAMP 蓄積試験の結果を示すグラフである。

図 9 は、A431 細胞およびヒト心臓組織における新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプの発現を示す電気泳動像 (a) および RT-PCR により増幅される領域の制限酵素地図 (b) である。

#### 発明の簡単な説明

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプは、 $[^{125}\text{I}]$ シアノピンドロールに対する  $K_d$  値が約 75 pM であり、且つ、実質的に配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する。かかるアミノ酸配列は、該  $\beta_2$ -AR サブタイプの立体構造や上記理化学的性質を変化させない限り特に限定されず、アミノ酸配列の一部に少なくとも 1 アミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を有していてもよい。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプの  $[^{125}\text{I}]$ シアノピンドロールに対する  $K_d$  値とは、当該  $\beta_2$ -AR サブタイプを発現する形質転換チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた受容体結合試験より導かれる当該サブタイプと  $[^{125}\text{I}]$ シアノピンドロールとの結合の解離定数である。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプの由来は、動物細胞または動物組織であれば特に限定されないが、好ましくは哺乳動物細胞または哺乳動物組織、より好ましくはヒト培養細胞またはヒト組織である。培養細胞としては類表皮癌細胞株 A 4 3 1 細胞等が、組織としては心臓または大脳皮質組織等が例示される。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプは動物組織または動物細胞を原料として抽出精製する方法、化学的に合成する方法または遺伝子組み換え技術等公知手法を適宜用いることによって製造することができる。好ましくは、該タンパク質をコードする DNA を、ヒト培養細胞またはヒト組織の RNA もしくは DNA より既知  $\beta_2$ -AR の cDNA 部分配列をプライマーとして PCR 法により、或いは該 cDNA の一部または全部をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションによりクローニングし、次いでクローニングした DNA を含有する組換えベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによって該新規タンパク質を採取する方法が例示される。

本発明の DNA は、本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA であれば特に限定されないが、好ましくは、配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA、より好ましくは、配列表配列番号 2 に示される塩基配列中、少なくとも塩基番号 1 0 1 乃至 1 3 4 5 で示される塩基配列を有する DNA である。

本発明の DNA はいかなる方法で得られるものであってもよい。例えば、mRNA から調製される相補 DNA (cDNA)、ゲノミックライブラリーから調製されるゲノミック DNA、化学的に合成される DNA、RNA または DNA を鋳型として PCR 法により増幅させて得られる DNA およびこれらの方法を適当に組み合わせて構築される DNA をも全て包含するものである。

一例として、新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを発現する細胞または組織由来の RNA から RT-PCR 法を用いて該新規サブタイプの cDNA をクローン化する、以下の方法が挙げられる。

まず、新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを発現する細胞または組織、好ましくはヒト培

養細胞またはヒト組織、就中A 4 3 1細胞またはヒト心臓組織より、例えば、グアニジンチオシアネート法、熱フェノール法、酸グアニジン-フェノールクロロホルム (AGPC) 法等の公知の方法を用いて全RNAを抽出する。得られる全RNAをそのままRT-PCRに供しても、また、さらにオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーを行って、ポリ(A) RNAを精製してもよい。

次いで、得られたRNAを鋳型として逆転写酵素を用いる公知の方法で一本鎖cDNAを合成した後、既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAの一部と相同な配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行うことにより、目的の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ二本鎖cDNAが得られる。プライマーとして用いる既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAの領域は特に限定されないが、1回の操作で新規 $\beta_2$ -ARサブタイプの全コード領域を増幅させるためには、5' および3' 非翻訳領域の一部をそれぞれセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いることが望ましい。またクローニングベクターへの挿入のための制限酵素部位を付加したプライマーを用いることもできる。

増幅された新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA断片は、ゲル電気泳動により分離した後、当該断片を含むゲル部分を切り出し、カラム等により精製する。これを必要に応じて適当な制限酵素で処理、またはリンカーDNAを連結して、適当なクローニングベクター中に挿入する。クローニングベクターは特に限定されないが、例えばpBR322、pUC119、pBluescript等が挙げられる。

このようにしてクローン化された新規 $\beta_2$ -ARサブタイプDNAの塩基配列は公知のマキサム・ギルバート法やジデオキシターミネーション法によって決定することができる。

本発明の組換えベクターは、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。



当該組換えベクターは、簡便には当分野において入手可能な発現ベクターに本発明の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプをコードするDNAを常法により機能的に連結することによって調製することができる。用いる発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主内で機能して当該 $\beta_2$ -ARサブタイプを発現し得るものであれば特に制限されないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子を含有することが好ましい。例えば哺乳動物細胞を形質転換する場合、動物ウイルス、例えばSV40、RSV、MMLV等のプロモーターおよびポリアデニル化シグナルが1種以上のユニークな制限酵素認識部位、好ましくはマルチクローニング部位を介して連結されたプラスミド、例えばpKCRH2等の適当な部位に、pSV2-neo、pSV2-dhfr等のプラスミド由来の選択マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素等）が挿入されたプラスミドを使用することができる。

本発明の形質転換細胞は、新規 $\beta_2$ -ARサブタイプをコードするDNAを含有する上述の発現ベクターを、適当な宿主細胞に導入することにより調製することができる。宿主細胞は、使用する発現ベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に制限されず、当該技術分野において通常使用される天然に存在する細胞或いは人工的に作製された組換え細胞など種々の細胞が利用できるが、内因性 $\beta_2$ -AR遺伝子を有しないか、もしくは該遺伝子を有していても発現しない細胞がより好ましい。具体的には、大腸菌、枯草菌等の細菌、酵母等の真菌類、動物細胞または昆虫細胞等が例示される。好ましくは哺乳動物細胞、特にハムスター由来細胞（CHO、BHK等）、マウス由来細胞（COP, L, C127, Sp2/0, NS-1, NIH3T3等）、ラット由来細胞、サル由来細胞（COS1, COS3, COS7, CV1, Vero等）およびヒト由来細胞（Hela, 2倍体線維芽細胞由来細胞, ミエローマ細胞, Namalwa等）が挙げられる。

発現ベクターの宿主細胞への導入は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、哺乳動物細胞へ導入する場合、リン酸カルシウム共沈殿法、プロト

プラスト融合法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リポソーム法等が挙げられる。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプは、上記のごとく調製される発現ベクターを含む形質転換細胞を培養することによって製造することができる。培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖等が、窒素源としては、例えばアンモニウム塩、硝酸塩、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、馬鈴薯抽出液等が例示される。また、所望により他の栄養素〔例えば、無機塩（塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等）、ビタミン類、抗生物質（テトラサイクリン、ネオマイシン、カナマイシン、アンピシリン）を含んでいてもよい。

培養は当分野において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH および培養時間は、 $\beta_2$ -AR サブタイプタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

例えば、宿主が動物細胞である場合、培地として例えば約 5～20% のウシ胎児血清（FCS）を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改変最少必須培地（DMEM）、RPMI-1640 培地、199 培地等を用いることができる。培地の pH は約 6～8 であることが好ましく、培養は通常 30～40℃ で約 15～72 時間行われ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプは、宿主細胞の原形質膜上に膜貫通タンパク質として存在する。したがって、該タンパク質は上記のごとく培養して得られる培養物から以下の方法により取得される。

まず培養物を濾過または遠心分離等の常法に付して細胞を回収し、適当な緩衝液中に懸濁して、さらに界面活性剤を適当な濃度で加えて膜を可溶化する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド（CTAB）等が挙げられるが、これらは強力なタンパク質変

性作用を有するので、タンパク質が生物活性を持つように折り畳まれるためには、透析などにより、過剰な該界面活性剤を、例えばT r i t o n X-100等の穏やかな非イオン性界面活性剤を含む緩衝液と交換して除去するか、もしくは適当な濃度まで希釈する必要がある。以下、界面活性剤の存在下で一般に用いられる方法を適宜組み合わせることによって新規 $\beta_2$ -ARサブタイプを単離精製することができる。例えば、塩析、溶媒沈殿法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

本発明の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプを用いて、当該 $\beta_2$ -ARサブタイプのアゴニストおよび／またはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。用いられる新規 $\beta_2$ -ARサブタイプは、当該 $\beta_2$ -ARサブタイプを発現する形質転換細胞の形態であることが好ましい。例えば、以下のスクリーニング方法が挙げられる。

(1) 受容体結合試験：一定量の上記形質転換細胞を適当な緩衝液を含む培地中で種々の濃度の試験化合物とともに予め一定時間反応させた後、新規 $\beta_2$ -ARサブタイプに対する既知の放射性リガンド、例えば $[^{125}\text{I}]$ シアノピンドロール等がある濃度（例えば $K_d$ 値の濃度）で添加し、さらに一定時間反応させる。反応終了後、細胞を回収してその放射活性を測定し、放射性リガンドを単独で加えた時の特異的結合による放射活性を100%として放射性リガンドの特異的結合の割合を試験化合物の濃度に対してプロットして置換曲線を作成する。該結合の割合を50%減少させる試験化合物の濃度（ $IC_{50}$ ）を置換曲線より読み取り、この値を試験化合物の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプに対する見かけの親和性として評価する。なお、リガンドの非特異的結合による放射活性は過剰量の $\beta$ -拮抗薬、例えば(-)-アルプレノロール等をさらに添加した場合の放射活性を差し引くことによ

り補正される。

(2) cAMP蓄積試験：一定量の上記形質転換細胞を、アデニル酸シクラーゼの基質やコファクター、およびホスホジエステラーゼ阻害剤（例えば、3-イソブチル-1-メチルキサンチン等）などを含む適当な緩衝液中で種々の濃度の試験化合物とともに一定時間反応させた後、生成、蓄積するcAMP量をエンザイムイムノアッセイ（EIA）法等により測定し、最大濃度の試験化合物添加時のcAMP量を100%、非添加時のcAMP量を0%として濃度-反応曲線を作成し、50%の蓄積率を引き起こす試験化合物の濃度（EC<sub>50</sub>）を算出、評価する。

受容体結合試験において新規β<sub>2</sub>-ARサブタイプに対して親和性を有する試験化合物のうち、cAMP蓄積試験においてcAMP蓄積作用を有するものは当該新規サブタイプのアゴニストであり、cAMP蓄積作用が認められないものはアンタゴニストであると判定できる。

本発明の新規β<sub>2</sub>-ARサブタイプのアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング用キットは、当該β<sub>2</sub>-ARサブタイプを含むものであれば特に制限されない。該タンパク質は通常の生理活性を有する限りどのような形態であってもよく、単離精製されたものでも、或いは該タンパク質を発現する形質転換細胞であってもよい。好ましくは、タンパク質の安定化や取り扱いの容易さを考慮して、該タンパク質を発現する形質転換動物培養細胞が例示される。但し、この場合は細胞あたりの発現量が均一な細胞株を使用することが望ましい。

また、本発明のスクリーニング用キットは、さらに受容体結合試験において使用される標識リガンドを含む試薬およびcAMP蓄積試験において使用されるcAMP定量用試薬を含むものであることがより好ましい。標識リガンドとしては[<sup>125</sup>I]シアノピンドロール、[<sup>3</sup>H]ジヒドロアルプレノロール、[<sup>3</sup>H]キャラゾール等が例示される。またcAMP定量用試薬としては、cAMPに対する抗体およびその検出試薬類が例示される。

また上記以外で受容体結合試験またはcAMP蓄積試験において使用される各

種試薬（例えば緩衝液、培地等）および器具（例えば、反応容器等）を含めてもよい。

細胞または組織において、本発明の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプが発現していることを、当該新規サブタイプcDNAと既知のヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAとの塩基配列の相違を利用して両者を区別することにより判別することができる。具体的な検定法の例については、後記実施例5にて詳述する。

以下に、実施例および試験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

#### 実施例1 A431細胞からの新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプのcDNAクローニング

CO<sub>2</sub> インキュベーター（LNA-122D；TBAI社製）中、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で、ダルベッコ改変最少必須培地（DMEM）に細胞密度 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞／シャーレとなるように継代培養されたヒト類表皮癌細胞A431細胞株〔大日本製薬（株）製、カタログ番号：09-1555〕 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞をRNAzol™（BIOTECX LABORATORIES社製）に溶解し、遠心分離後の水層にイソプロパノールを加えて全RNAを抽出した。次いで、該RNA試料を鋳型としてRT-PCR法により目的の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプのcDNAを増幅させた。

RT-PCR反応はSuper Script™ Preamplification System（Life Technologies社製）を用い、添付のプロトコルに従って行った。

1) 逆転写反応：以下の組成の反応液を調製し、70℃で10分間、次いで42℃で50分間インキュベートして一本鎖cDNAを合成した。

各dNTP	20nmol / 20μL
RNA sin	20単位
オリゴdT	100pmol
A431細胞由来全RNA試料	5μg
MoMuLV由来逆転写酵素	200単位

さらに、 $5^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱してRNAとcDNAを解離させると共に逆転写酵素を失活させ、直ちに氷冷し、以下のPCR増幅反応に供した。

2) PCR増幅：下記合成オリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして使用した。

センスプライマー ( $\beta_2$ -N1)：

5' - ACACCTGCAGGTGAGGCTTCCAGGCGTCC - 3' (配列表配列番号4)

アンチセンスプライマー ( $\beta_2$ -C1)：

5' - CACAAGCTTGTCTGTTTGTCTGTTGG - 3' (配列表配列番号5)

$\beta_2$ -N1は、既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAの5' 非翻訳領域の一部(配列表配列番号3の塩基番号90~107に相当する)と同一の配列およびその上流にSse8387I認識部位を有するものであり、 $\beta_2$ -C1は該cDNAの3' 非翻訳領域の一部(配列表配列番号3の塩基番号1466~1486に相当する)に相補的な配列およびその下流にHindIII 認識部位を有するものである。既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAの場合、これらのプライマーによって約1.4 kbpの増幅断片が得られる。

逆転写反応溶液に上記プライマーをそれぞれ25 pmol、および2単位のTaq DNAポリメラーゼを添加し、滅菌蒸留水で全量100  $\mu\text{L}$ として、自動サーマルサイクラー(PERKIN ELMER社製)を用いて以下の条件で30サイクル増幅反応を行った。(1)変性： $95^{\circ}\text{C}$ 、30秒、(2)アニーリング： $55^{\circ}\text{C}$ 、30秒、(3)伸長： $72^{\circ}\text{C}$ 、1分。反応終了後、反応液を制限酵素Sse8387IおよびHindIIIで消化し、アガロースゲル電気泳動に付したところ、約1.4 kbpの1本のバンドが検出された。

3) cDNAクローニングおよびシーケンス：このバンド部分のゲルを切り出し、Spin Bind<sup>TM</sup> DNA Recovery System (FMC BioProducts 社製)を用いてcDNA断片を精製・回収した。DNA Ligation Kit (宝酒造社製)を用いて該断片をSse8387IおよびHindIIIで消化したpUC119ベクターに、挿入し、常法に従って大腸菌HB101に導入後、アンピシリン100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有LB寒天上

で形質転換体を選択した。得られた形質転換体をLB培地で液体培養した後アルカリ法によりプラスミドDNA (pUC $\beta_2$ ) を抽出、電気泳動にてcDNAの挿入を確認した後、インサート部分の塩基配列をBcaBEST™ Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造社製) を用いて決定した。以上の工程を図1に模式的に示す。

図2および3にクローニングされたcDNAの全塩基配列および該DNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す(但し、図2中、塩基番号-100~-83および図3中、塩基番号1280~1300で示される配列は、それぞれPCR反応に用いたセンスおよびアンチセンスプライマー部分に相当するので、当該領域内の塩基の一部は本来のcDNAの配列と異なる可能性がある)。

このcDNAは全長1400bpで415アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を有していた(配列表配列番号2の塩基配列中、塩基番号101~1345に相当する)。既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNA (配列表配列番号3の塩基配列中、塩基番号90~1486で表される配列が、クローニングされたcDNAの全長に対応する部分である) とのホモロジー比較の結果、クローニングされたcDNAは、アミノ酸配列において既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAと96.6%の相同性を有していたが、41の塩基置換が存在し、そのうち30がORF内部にあり、さらにその内の13がアミノ酸置換をもたらすものであった(図2中、クローニングされたcDNAの塩基配列の上段に、既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAの塩基配列の中で新規cDNAの塩基配列と異なる塩基を、また、クローニングされたcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列の下段に、既知のヒト $\beta_2$ -ARのアミノ酸配列の中で新規タンパク質のアミノ酸配列と異なるアミノ酸をそれぞれ記載している)。また、5' 非翻訳領域内に連続する6塩基(TGCGAA)中5塩基が既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNA(CCCAGC)と異なる部分が認められた。さらに、357位のアスパラギン(Asn)の後に既知のヒト $\beta_2$ -ARにはない2アミノ酸〔セリン(Ser)-アスパラギン(Asn)〕が挿入されていた。

実施例2 ヒト心臓組織からの新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプのcDNAクローニ

ング

ヒト心臓組織由来のmRNA (CLONTECH社製) を材料として、実施例1と同様の方法で新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAをクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、ヒト心臓組織由来の新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAはA431細胞由来のものと比較して3塩基の置換〔図2中、塩基番号238のチミン(T)がアデニン(A)に、図3中、塩基番号823のチミン(T)がシトシン(C)に、1143のアデニン(A)がグアニン(G)にそれぞれ変化している〕がみられ、そのうちの1つがアミノ酸の置換〔図2中、80位のロイシン(Leu)がイソロイシン(Ile)に変化している〕を引き起こすものである以外は、全く共通であった。

### 実施例3 動物細胞用新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ発現プラスミドの作製

図4および5に示したストラテジーに従い、新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプを機能的に担持する動物細胞用発現プラスミドを構築した。

1) SV40プロモーターと同ポリアデニル化シグナルとの間にHindIII 認識部位を有する動物細胞用発現ベクターpKCRH2 [Mishina ら, *Nature*, 307: 604-608 (1984)] をSalI で消化し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて末端平滑化後、別の動物細胞用発現ベクターpSV2-neo [SouthernとBerg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 327-341 (1982)] をAccIおよびAatIIで消化して得られるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(nptII) の発現カセットを含む3.67kbp断片(同様に末端平滑化したもの)をこれにライゲーションし、常法により大腸菌HB101に導入してアンピシリン100 $\mu$ g/mLおよびカナマイシン25 $\mu$ g/mL含有LB寒天上で形質転換体を選択した。得られた形質転換体からプラスミドDNA(pKCN0)を抽出し、一部を電気泳動してネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の挿入を確認した後、該プラスミドをHindIIIで消化し、下記の合成アダプターを挿入してマルチクローニング部位を導入し、これを大腸菌HB101に導入してアンピシリン100 $\mu$ g/mLを含むLB寒天上で形質転換体を選択、常法によりプラスミドDNA(pKC



N1)を抽出した。マルチクローニング部位の挿入は、得られたプラスミドDNAを*Dra*Iおよび*Hind*IIIで消化して電気泳動し、約430bpの位置にバンドが検出されることにより確認した(pKCN0の場合、約380bpのバンドが得られる)。

合成アダプター (配列表配列番号6) :

5' - AGCTCCTGCAGGCGCGCCGATATCTCGAGCGGCCGCGGTACCA - 3'

3' - GGACGTCCGCGCGGCTATAGAGCTCGCCGCGCCATGGTTCCA - 5'

2) 実施例1で作製した新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAを含むプラスミドpUC $\beta_2$ を*Sse*8387Iおよび*Hind*IIIで消化し、2%NuSieve™3:1 Agarose (宝酒造社製)ゲルを用いて電気泳動し、約1.4kbpの断片を回収精製した。該断片と、*Sse*8387Iおよび*Hind*IIIで消化したpKCN1の8.3kbp断片とをライゲーションし、常法により大腸菌HB101に導入、アンピシリン100 $\mu$ g/mLを含むLB寒天上で形質転換体を選択した。得られた形質転換体を培養後、常法によりプラスミドDNAを抽出し、*Sse*8387Iおよび*Hind*IIIで消化した後、電気泳動して新規 $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAの挿入を確認した。

以上により、得られた動物細胞用新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ発現プラスミドをpKREX20と命名した。

#### 実施例4 新規 $\beta_2$ -ARサブタイプ高発現CHO細胞株の作製

プラスミドpKREX20をリン酸カルシウム共沈澱法によりチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO-K1(ATCC:CCL-61)に導入し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(LNA-122D; TABAI社製)中、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で、10%ウシ胎児血清、11.5 $\mu$ g/mLのプロリンおよび600 $\mu$ g/mLのG-418(Life Technologies社製)を含むDMEM培地(ICN Biomedicals社製)で14日間培養し、形質転換細胞株を選択した。

50個のG-418耐性クローンについて、培地を除去後0.5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中、37℃で10分間静置することによって細胞を培養器から剝離した。次いで遠心分離に

より細胞を集め、1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に細胞密度約  $5 \times 10^6$  細胞/mLになるように懸濁した。該懸濁液 20  $\mu$ L および 1.5 nM [ $^{125}$ I]シアノピンドロール (CYP) を、1% ウシ血清アルブミン、0.1% NaN<sub>3</sub> および 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を含む RPMI-1640 培地 (ICN Biomedicals 社製) 200  $\mu$ L 中で混合し、4°C で 2 時間静置した。バイオドット装置 (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いて、あらかじめ 0.3% ポリエチレンイミンに浸したガラスフィルター GF/C (Whatman 社製) で濾過洗浄し、フィルター上の放射活性を  $\gamma$  線計数管を用いて測定した。放射活性の最も高いクローンを選び、新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ高発現細胞株 CHO/pKREX20-58 と命名した。

#### 試験例 1 新規ヒト $\beta_2$ -AR サブタイプへの放射性リガンド結合性試験

実施例 4 で得られた新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ高発現細胞株 CHO/pKREX20-58 を、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で、10% ウシ胎児血清、11.5  $\mu$ g/mL のプロリンおよび 200  $\mu$ g/mL の G-418 を含む DMEM 培地で 3 日間培養し、培地を除去後 0.5 mM EDTA を含む PBS 中、37°C で 10 分間静置することによって細胞を培養器から剝離した。次いで遠心分離により細胞を集め、1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に細胞密度約  $5 \times 10^6$  細胞/mL になるように懸濁した。該懸濁液 20  $\mu$ L および種々の濃度の [ $^{125}$ I]CYP を、1% ウシ血清アルブミン、0.1% NaN<sub>3</sub> および 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を含む RPMI-1640 培地 200  $\mu$ L 中で混合し、4°C で 4 時間静置した (反応物 A)。別途に、上記混合物にさらに  $\beta$ -受容体拮抗薬である (-)-アルブレノロール (100  $\mu$ M) を添加した試料を調製し、同様に 4°C で 4 時間反応させた (反応物 B)。それぞれについて、実施例 4 と同様の方法で放射活性を測定した。

反応物 B における放射活性は非特異的結合によるものであるから、CHO/pKREX20-58 細胞上のヒト  $\beta_2$ -AR に特異的に結合した [ $^{125}$ I]CYP の放

射活性は下式にて与えられる。

〔特異的結合による放射活性〕＝

〔反応物 A の放射活性〕－〔反応物 B の放射活性〕

（なお、CHO-KI 細胞株について同様に実験した結果、当該細胞に内在の  $\beta_2$ -AR の発現は検出されなかった。）

各 [ $^{125}$ I]CYP 濃度における特異的結合による放射活性はミカエリス・メンテンの式に従って変化した（図 6）。したがって、CHO/pKREX20-58 細胞上で発現した新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプが、実際にリガンド結合能を有することが確認された。

また、遊離した [ $^{125}$ I]CYP の濃度を F、受容体と結合した [ $^{125}$ I]CYP の濃度（即ち、細胞あたりの [ $^{125}$ I]CYP と結合した受容体数）を B とし、B/F を縦軸に、B を横軸としてプロットした（Scatchard plot）結果を図 7 に示す。細胞あたりの受容体数を  $B_{max}$ 、結合の解離定数を  $K_d$  とすると、図 7 の直線は、

$$B/F = (-1/K_d) \cdot (B - B_{max})$$

で表される。

したがって、図 7 より CHO/pKREX20-58 細胞株 1 個あたりの新規ヒト  $\beta_2$ -AR の数は約 18,000 個/細胞、 $K_d$  値は 75 pM であることが示された。（既知のヒト  $\beta_2$ -AR cDNA を有する組換えベクターで形質転換した CHO 細胞の場合、1 細胞あたりの  $\beta_2$ -AR の数は約 47,000 個/細胞、 $K_d$  値は 32 pM である。）

## 試験例 2 cAMP 蓄積試験

新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプ高発現細胞株 CHO/pKREX20-58 を試験例 1 と同様に培養および回収し、1 mM アスコルビン酸および 1 mM の 3-イソブチルー 1-メチルキサンチンを含む Hanks' 平衡緩衝塩液（ICN Bio-medicals 社製）中に細胞密度  $2 \times 10^6$  細胞/mL となるように懸濁した。該懸濁液 100  $\mu$ L と種々の濃度の (-)-イソプロテレノール（IPT）を Hanks'

平衡緩衝塩液 500  $\mu$ L 中で混合し、37℃で30分間反応させた後5分間煮沸して反応を停止させた。該反応液を遠心分離した後上清中のcAMP量を cAMP EIA System (Amersham社製) を用いて測定した。10<sup>-5</sup>M (-)-IPT 添加時および (-)-IPT 非添加時のcAMP量をそれぞれ100%および0%とし、濃度-反応曲線から最小二乗法により50%のcAMP蓄積率を引き起こす濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出した。その結果、CHO/pKREX20-58を(-)-IPTにより刺激すると、濃度依存的なcAMP量の増加が認められ(図8)、そのEC<sub>50</sub>値は43 nMであった。したがって、CHO/pKREX20-58細胞上で発現した新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプが、実際にcAMP蓄積活性(アデニル酸シクラーゼ活性化作用)を有することが確認された。

実施例5 ヒト細胞および組織内での新規 $\beta_2$ -ARサブタイプの発現の検定

1) 実施例1の方法に従って抽出したA431細胞由来のmRNA、およびヒト心臓組織由来のmRNA (CLONTECH社製) を鋳型として、下記の合成オリゴヌクレオチドをそれぞれセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーに用いて実施例1の方法に従ってRT-PCRを行った。

センスプライマー ( $\beta_2$ -N2) :

5' -GGGAATGGCTACTCCAGCAAC -3' (配列表配列番号7)

アンチセンスプライマー ( $\beta_2$ -C2) :

5' -CTGCTTTACAGCAGTGAGTC -3' (配列表配列番号8)

$\beta_2$ -N2は新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA (配列表配列番号2の塩基配列中、塩基番号1151~1171に相当する) および既知のヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA (配列表配列番号3の塩基配列中、塩基番号1240~1260に相当する) と相同な配列を有するものであり、また、 $\beta_2$ -C2は新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA (配列表配列番号2の塩基配列中、塩基番号1334~1353に相当する) および既知のヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA (配列表配列番号3の塩基配列中、塩基番号1417~1436に相当する) に相補的な配列を有するものである。したがって、これらのプライマーを用いると、新規ヒト

$\beta_2$ -AR mRNAからは203bp、既知のヒト $\beta_2$ -AR mRNAからは197bpの増幅断片がそれぞれ得られる。

2) 上記1) で得られたRT-PCR反応液を2本に分け、一方をEcoRV、他方をPmaCIでそれぞれ消化し、2% アガロースゲル電気泳動により分離した。該アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色した結果、図9の(a)に示すようなバンドパターンが得られた。即ち、A431細胞由来のRT-PCR反応産物をEcoRV処理した場合、151および52bpの濃いバンドと46bpの薄いバンドが観察され、PmaCI処理した場合は203bpの濃いバンドと、146および51bpの薄いバンドが観察された。一方、ヒト心臓組織由来のRT-PCR反応産物をEcoRVで処理すると、151および46bpの濃いバンドと52bpの薄いバンドが見られ、PmaCIで処理した場合、A431細胞とは逆に203bpの薄いバンドと146および51bpの濃いバンドが観察された。

図9の(b)に示す通り、EcoRV処理により既知のヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA由来の197bp増幅断片は151bpおよび46bpの断片に、新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA由来の203bp増幅断片は151bpおよび52bpの断片にそれぞれ切断される。一方、PmaCIで処理した場合、既知のヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA由来の197bp増幅断片は146bpおよび51bpの断片に切断される。これに対し、新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNAでは配列表配列番号2の塩基番号1208で示される塩基がシトシン(C)に変異しているため、既知のヒト $\beta_2$ -AR cDNAに存在するPmaCI認識部位(配列表配列番号3の塩基配列中、塩基番号1288~1293に相当する)がなくなっている。したがって、新規ヒト $\beta_2$ -ARサブタイプcDNA由来の203bp増幅断片はPmaCIでは切断されない。

以上の結果より、A431細胞およびヒト心臓組織とも、新規 $\beta_2$ -ARと既知 $\beta_2$ -ARの両方のサブタイプが発現しているが、A431細胞では新規サブタイプが、ヒト心臓組織では既知サブタイプがより大量に発現していることが判明した。

本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプは、既知ヒト  $\beta_2$ -AR の 16 位のアルギニンがグリシンに置換している。Reihnsausらは、この置換を引き起こすDNAの多型を有する喘息患者が、特有の臨床上のプロファイルを示すことを報告している〔*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 8: 334-339 (1993)〕。したがって、本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを用いた当該サブタイプのアゴニストのスクリーニング法は、当該サブタイプが特異的に高い感受性を示すアゴニストを有効成分とする喘息治療薬、特に気管支平滑筋組織において本発明の新規  $\beta_2$ -AR サブタイプを主に発現する喘息患者に対する治療薬の開発研究に極めて有用である。

また、本発明の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプの発現の検定法は、上記特有の臨床上のプロファイルを示す喘息患者の診断に有効である。

さらにまた、本発明の新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプDNAを用いて遺伝子破壊により内在の  $\beta_2$ -AR をノックアウトした実験動物、およびさらに新規ヒト  $\beta_2$ -AR サブタイプDNAを機能的に組み込んだトランスジェニック実験動物を作出することは、 $\beta_2$ -AR の喘息疾患との関連性を解明するための研究材料として非常に有用である。

本出願は日本で出願された平成8年特許願第72914号を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含される。また、ここで述べられた刊行物に記載される内容は、ここにその全てが明示されたと同程度に本明細書中に組み込まれるものである。

## 配列表

配列の数 : 8

## (1) 配列番号 : 1 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 415

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

## (ix) 特徴 :

(D) その他の情報 : アミノ酸番号80のXaa は、Leu またはIle である。

## (xi) 配列の記載 : 配列番号 : 1

```

Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Gly
 1           5           10          15
Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Glu Arg Asp Glu Ala Trp
          20           25           30
Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val
          35           40           45
Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu
          50           55           60
Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Xaa
          65           70           75           80
Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met
          85           90           95
Lys Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile
          100          105          110
Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala

```

115	120	125
Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu		
130	135	140
Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val		
145	150	155
Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala		
165	170	175
Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Thr Cys Cys Asp		
180	185	190
Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe		
195	200	205
Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln		
210	215	220
Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe		
225	230	235
His Ala Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His		
245	250	255
Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Tyr Leu Lys Glu His Lys Ala Leu		
260	265	270
Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro		
275	280	285
Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Pro		
290	295	300
Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Val Gly Tyr Val Asn Ser Ala		
305	310	315
Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe		
325	330	335



BNSDOCID: &lt;WO\_\_9735963A1\_I\_&gt;

AAC GGC AGC GCC TTC CTG CTG GCA CCC AAC GGA AGC CAT GCG CCG GAC	163
Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Gly Ser His Ala Pro Asp	
10 15 20	
CAC GAC GTA ACG CAG GAA CGG GAC GAG GCG TGG GTG GTG GGC ATG GGC	211
His Asp Val Thr Gln Glu Arg Asp Glu Ala Trp Val Val Gly Met Gly	
25 30 35	
ATC GTC ATG TCT CTC ATC GTC CTG GCC ATC GTG TTT GGC AAT GTG CTG	259
Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu	
40 45 50	
GTC ATC ACA GCC ATT GCC AAG TTC GAG CGT CTG CAG ACG GTC ACC AAC	307
Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val Thr Asn	
55 60 65	
TAC TTC ATC ACT TCA CTG GCC TGT GCT GAC WTA GTC ATG GGC TTG GCA	355
Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Xaa Val Met Gly Leu Ala	
70 75 80 85	
GTG GTG CCC TTT GGG GCC GCC CAT ATT CTC ATG AAA ATG TGG ACT TTT	403
Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys Met Trp Thr Phe	
90 95 100	
GGC AAC TTC TGG TGC GAG TTT TGG ACT TCC ATT GAT GTG CTG TGC GTC	451
Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp Val Leu Cys Val	
105 110 115	
ACG GCC AGC ATT GAG ACC CTG TGC GTG ATC GCA GTG GAT CGC TAC TTT	499
Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe	
120 125 130	
GCC ATT ACT TCA CCC TTC AAG TAT CAG AGC CTG CTG ACC AAG AAT AAG	547
Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys	
135 140 145	

GCC CGG GTG ATC ATT CTG ATG GTG TGG ATC GTG TCA GGC CTT ACC TCC	595
Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val Ser Gly Leu Thr Ser	
150                                      155                                      160                                      165	
TTC TTG CCC ATT CAG ATG CAC TGG TAC CGG GCC ACC CAC CAG GAA GCC	643
Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala Thr His Gln Glu Ala	
170                                      175                                      180	
ATC AAC TGC TAC GCC AAG GAG ACC TGC TGT GAC TTC TTC ACG AAC CAA	691
Ile Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Thr Cys Cys Asp Phe Phe Thr Asn Gln	
185                                      190                                      195	
GCC TAT GCC ATT GCC TCC TCC ATC GTG TCC TTC TAC GTT CCC CTG GTG	739
Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Val	
200                                      205                                      210	
ATC ATG GTC TTC GTC TAC TCC AGG GTC TTT CAG GAG GCC AAA AGG CAG	787
Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln Glu Ala Lys Arg Gln	
215                                      220                                      225	
CTC CAG AAG ATT GAC AAA TCT GAG GGC CGC TTC CAT GCC CAG AAC CTT	835
Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe His Ala Gln Asn Leu	
230                                      235                                      240                                      245	
AGC CAG GTG GAG CAG GAT GGG CGG ACA GGG CAT GGA CTC CGC AGA TCT	883
Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His Gly Leu Arg Arg Ser	
250                                      255                                      260	
TCC AAG TTC TAC TTG AAG GAG CAC AAA GCC CTC AAG ACG YTA GGC ATC	931
Ser Lys Phe Tyr Leu Lys Glu His Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile	
265                                      270                                      275	
ATC ATG GGC ACT TTC ACC CTC TGC TGG CTG CCC TTC TTC ATC GTT AAC	979
Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Val Asn	
280                                      285                                      290	

ATT GTG CAT GTG ATC CAG GAT AAC CTC ATC CCT AAG GAA GTT TAC ATC 1027  
 Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Pro Lys Glu Val Tyr Ile  
 295 300 305  
 CTC CTA AAT TGG GTG GGC TAT GTC AAT TCT GCT TTC AAT CCC CTT ATC 1075  
 Leu Leu Asn Trp Val Gly Tyr Val Asn Ser Ala Phe Asn Pro Leu Ile  
 310 315 320 325  
 TAC TGC CGG AGC CCA GAT TTC AGG ATT GCC TTC CAG GAG CTT CTG TGT 1123  
 Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe Gln Glu Leu Leu Cys  
 330 335 340  
 CTG CGC AGG TCT TCT TTG AAG GCC TGT GGG AAT GGC TAC TCC AGC AAC 1171  
 Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Cys Gly Asn Gly Tyr Ser Ser Asn  
 345 350 355  
 AGC AAT GGC AAC ACA GGG GAG CAG AGT GGA TAT CAC CTG GAA CAG GAG 1219  
 Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Tyr His Leu Glu Gln Glu  
 360 365 370  
 AAA GAA AAT AAA CTG CTG TGT GAR GAC CTC CCA GGC ACG GAA GAC TTT 1267  
 Lys Glu Asn Lys Leu Leu Cys Glu Asp Leu Pro Gly Thr Glu Asp Phe  
 375 380 385  
 GTG GGC CAT CAA GGT ACT GTG CCT AGC GAT AAC ATT GAT TCA CCA GGC 1315  
 Val Gly His Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Asn Ile Asp Ser Pro Gly  
 390 395 400 405  
 AGG AGT TGT AGT ACA AAT GAC TCA CTG CTG TAAAGCAGTT TTTCTACTTT 1365  
 Arg Ser Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu  
 410 415  
 TTAAGACCAC CCCCCAACA GAACACTAAA CAGAC 1400

(1) 配列番号 : 3 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 配列の長さ : 1999

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA to mRNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 3

TGGAAGTGGC AGGCACCGCG AGCCCCTAGC ACCCGACAAG CTGAGTGTGC AGGACGAGTC 60  
 CCCACCACAC CCACACCACA GCCGCTGAAT GAGGCTTCCA GGCGTCCGCT CGCGGCCCCG 120  
 AGAGCCCCGC CGTGGGTCCG CCCGCTGAGG CGCCCCCAGC CAGTGGCGCTT ACCTGCCAGA 180  
 CTGCGCGGCC ATG GGG CAA CCC GGG AAC GGC AGC GCC TTC TTG CTG GCA CCC 231  
 Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro  
 1 5 10  
 AAT AGA AGC CAT GCG CCG GAC CAC GAC GTC ACG CAG CAA AGG GAC GAG 279  
 Asn Arg Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu  
 15 20 25 30  
 GTG TGG GTG GTG GGC ATG GGC ATC GTC ATG TCT CTC ATC GTC CTG GCC 327  
 Val Trp Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala  
 35 40 45  
 ATC GTG TTT GGC AAT GTG CTG GTC ATC ACA GCC ATT GCC AAG TTC GAG 375  
 Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu  
 50 55 60  
 CGT CTG CAG ACG GTC ACC AAC TAC TTC ATC ACT TCA CTG GCC TGT GCT 423  
 Arg Leu Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala  
 65 70 75  
 GAT CTG GTC ATG GGC CTG GCA GTG GTG CCC TTT GGG GCC GCC CAT ATT 471  
 Asp Leu Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile

80	85	90	
CTT ATG AAA ATG TGG ACT TTT GGC AAC TTC TGG TGC GAG TTT TGG ACT			519
Leu Met Lys Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr			
95	100	105	110
TCC ATT GAT GTG CTG TGC GTC ACG GCC AGC ATT GAG ACC CTG TGC GTG			567
Ser Ile Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val			
115	120	125	
ATC GCA GTG GAT CGC TAC TTT GCC ATT ACT TCA CCT TTC AAG TAC CAG			615
Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln			
130	135	140	
AGC CTG CTG ACC AAG AAT AAG GCC CGG GTG ATC ATT CTG ATG GTG TGG			663
Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp			
145	150	155	
ATT GTG TCA GGC CTT ACC TCC TTC TTG CCC ATT CAG ATG CAC TGG TAC			711
Ile Val Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr			
160	165	170	
CGG GCC ACC CAC CAG GAA GCC ATC AAC TGC TAT GCC AAT GAG ACC TGC			759
Arg Ala Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Asn Glu Thr Cys			
175	180	185	190
TGT GAC TTC TTC ACG AAC CAA GCC TAT GCC ATT GCC TCT TCC ATC GTG			807
Cys Asp Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val			
195	200	205	
TCC TTC TAC GTT CCC CTG GTG ATC ATG GTC TTC GTC TAC TCC AGG GTC			855
Ser Phe Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val			
210	215	220	
TTT CAG GAG GCC AAA AGG CAG CTC CAG AAG ATT GAC AAA TCT GAG GGC			903
Phe Gln Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly			

225	230	235	
CGC TTC CAT GTC CAG AAC CTT AGC CAG GTG GAG CAG GAT GGG CGG ACC			951
Arg Phe His Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr			
240	245	250	
GGG CAT GGA CTC CGC AGA TCT TCC AAG TTC TGC TTG AAG GAG CAC AAA			999
Gly His Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys			
255	260	265	270
GCC CTC AAG ACG TTA GGC ATC ATC ATG GGC ACT TTC ACC CTC TGC TGG			1047
Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp			
275	280	285	
CTG CCC TTC TTC ATC GTT AAC ATT GTG CAT GTG ATC CAG GAT AAC CTC			1095
Leu Pro Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu			
290	295	300	
ATC CGT AAG GAA GTT TAC ATC CTC CTA AAT TGG ATA GGC TAT GTC AAT			1143
Ile Arg Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Ile Gly Tyr Val Asn			
305	310	315	
TCT GGT TTC AAT CCC CTT ATC TAC TGC CGG AGC CCA GAT TTC AGG ATT			1191
Ser Gly Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile			
320	325	330	
GCC TTC CAG GAG CTT CTG TGC CTG CGC AGG TCT TCT TTG AAG GCC TAT			1239
Ala Phe Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Tyr			
335	340	345	350
GGG AAT GGC TAC TCC AGC AAC GGC AAC ACA GGG GAG CAG AGT GGA TAT			1287
Gly Asn Gly Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Tyr			
355	360	365	
CAC GTG GAA CAG GAG AAA GAA AAT AAA CTG CTG TGT GAA GAC CTC CCA			1335
His Val Glu Gln Glu Lys Glu Asn Lys Leu Leu Cys Glu Asp Leu Pro			

370	375	380	
GGC ACG GAA GAC TTT GTG GGC CAT CAA GGT ACT GTG CCT AGC GAT AAC			1383
Gly Thr Glu Asp Phe Val Gly His Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Asn			
385	390	395	
ATT GAT TCA CAA GGG AGG AAT TGT AGT ACA AAT GAC TCA CTG CTG			1428
Ile Asp Ser Gln Gly Arg Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu			
400	405	410	413
TAAAGCAGTT TTTCTACTTT TAAAGACCCC CCCCCCCCCA ACAGAACACT AAACAGACTA			1488
TTTAACTTGA GGGTAATAAA CTTAGAATAA AATTGTAAAA ATTGTATAGA GATATGCAGA			1548
AGGAAGGGCA TCCTTCTGCC TTTTTTATTT TTTTAAGCTG TAAAAAGAGA GAAAACTTAT			1608
TTGAGTGATT ATTTGTTATT TGTACAGTTC AGTTCCTCTT TGCATGGAAT TTGTAAGTTT			1668
ATGTCTAAAG AGCTTTAGTC CTAGAGGACC TGAGTCTGCT ATATTTTCAT GACTTTTCCA			1728
TGTATCTACC TCACTATTCA AGTATTAGGG GTAATATATT GCTGCTGGTA ATTTGTATCT			1788
GAAGGAGATT TTCCTTCCTA CACCCTTGGA CTTGAGGATT TTGAGTATCT CGGACCTTTC			1848
AGCTGTGAAC ATGGACTCTT CCCCCACTCC TCTTATTTGC TCACACGGGG TATTTTAGGC			1908
AGGGATTTGA GGAGCAGCTT CAGTTGTTTT CCCGAGCAAA GGTCTAAAGT TTACAGTAAA			1968
TAAAATGTTT GACCATGAAA AAAAAAAAAA A			1999

## (1) 配列番号 : 4 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 配列の長さ : 29

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 4

ACACCTGCAG GTGAGGCTTC CAGGCGTCC 29



## (1) 配列番号 : 5 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 配列の長さ : 30

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 5

CACAAGCTTG TCTGTTTACT GTTCTGTTGG 30

## (1) 配列番号 : 6 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 配列の長さ : 43

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

(ix) 特徴 :

(D) 塩基番号1-4 には相補鎖が存在せず、相補鎖には塩基番号43の下流に  
4 塩基TCGAが存在する。

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 6

AGCTCCTGCA GGCGGCCGA TATCTCGAGC GGCCGCGGTA CCA 43

## (1) 配列番号 : 7 に関する情報

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 配列の長さ : 21

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸 (合成DNA)

(xi) 配列の記載：配列番号：7

GGGAATGGCT ACTCCAGCAA C 21

(1) 配列番号：8 に関する情報

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：配列の長さ：20

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸 (合成DNA)

(xi) 配列の記載：配列番号：8

CTGCTTTACA GCAGTGAGTC 20

## 請求の範囲

1.  $[^{125}\text{I}]$ シアノピンドロールに対する  $K_d$  値が約 75 pM であり、且つ、実質的に配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプ。
2. ヒト由来である請求の範囲 1 の  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプ。
3. A 4 3 1 細胞またはヒト心臓由来である請求の範囲 2 の  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプ。
4. 請求の範囲 1～3 のいずれかの  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプをコードする塩基配列を有する DNA。
5. 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中、少なくとも塩基番号 101 乃至 1345 で示される塩基配列を有する請求の範囲 4 の DNA。
6. 請求の範囲 4 または 5 の DNA を含有する組換えベクター。
7. 請求の範囲 6 の組換えベクターで形質転換された宿主細胞。
8. 宿主細胞が動物細胞である請求の範囲 7 の宿主細胞。
9. 動物細胞が CHO 細胞である請求の範囲 8 の宿主細胞。
10. 請求の範囲 7～9 のいずれかの宿主細胞を培養し、得られる培養物から  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプを採取することを含む、下記性質を有する  $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプの製造方法：

(i) [ $^{125}$ I]シアノピンドロールに対するK<sub>d</sub>値：約75 pM

(ii) 実質的に配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する。

11. 請求の範囲1～3のいずれかの $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプを用いる当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング法。

12. 請求の範囲7～9のいずれかの宿主細胞を用いる $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング法。

13. 請求の範囲1～3のいずれかの $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプを含む当該 $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット。

14. 請求項7～9のいずれかの宿主細胞を含む $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット。

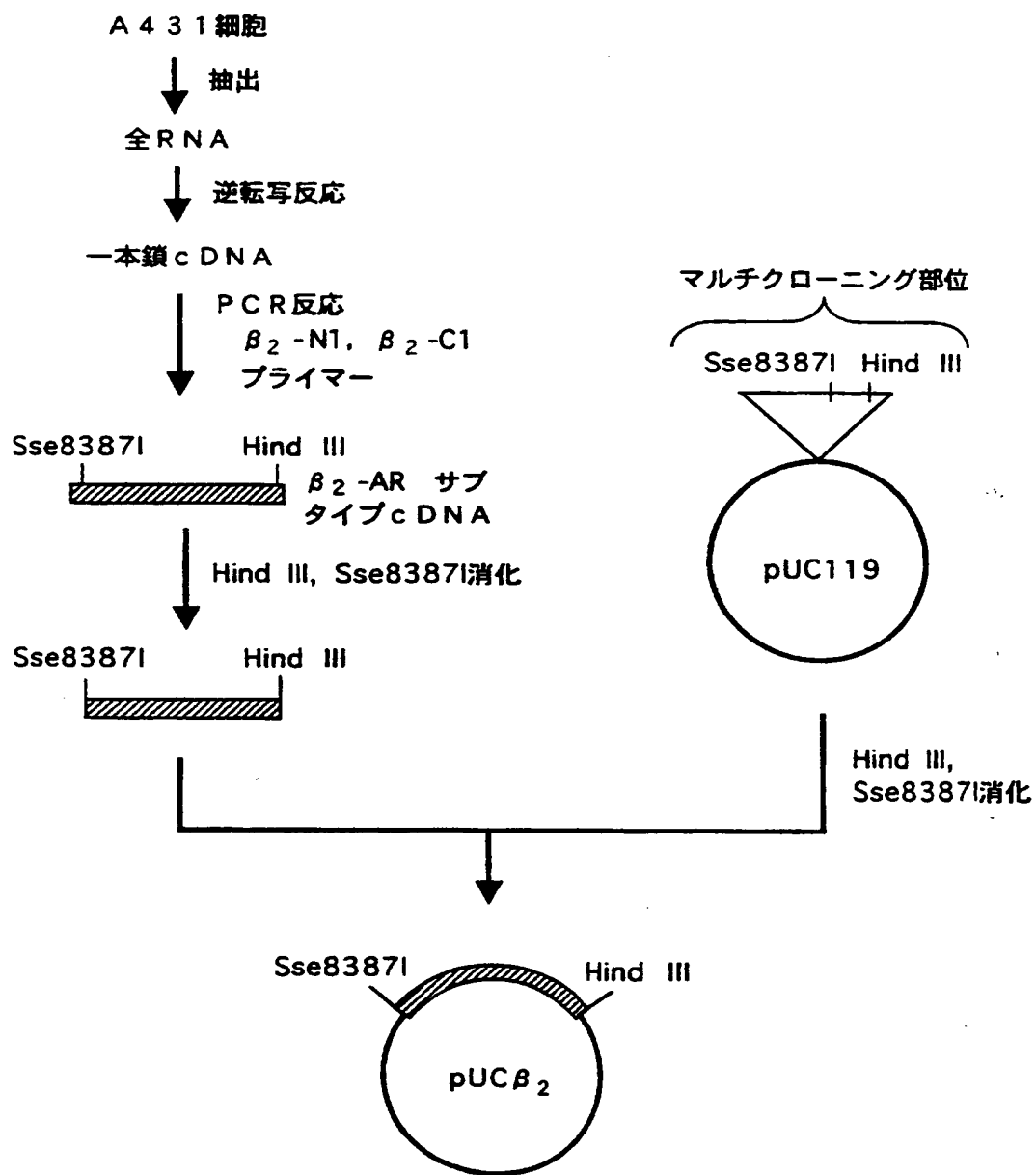
15. さらに標識リガンドを含む試薬およびcAMP定量用試薬を含む請求項13または14のスクリーニング用キット。

16. 請求項4または5のDNAの一部または全部を検出することを含む、下記性質を有する $\beta_2$ -アドレナリン受容体サブタイプの発現の検定方法：

(i) [ $^{125}$ I]シアノピンドロールに対するK<sub>d</sub>値：約75 pM

(ii) 実質的に配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する。

図 1



	-100	TGAGGCTTCACGGGTCCGC	-81				
C	T	C	CC AGC	T			
TTTGGGGCCCGCAGAGCCCGCGGGGTCTGCCCGCTGAGGGCGCTTGGAACAGTGGCTCADCTGCCAGACTGGGGGC				-1			
			T	T A			
ATG GGG CAA CCC GGG AAC GGC AGC GCC TTC CTG CTG GCA CCC AAC GGA AGC CAT GGG CGG				60			
Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Gly Ser His Ala Pro				20			
				Arg			
GAC CAC GAC GTA ACG CAG GAA CCG GAC GAG GCG TGG GTG GTG GGC ATG GGC ATC GTC ATG				120			
Asp His Asp Val Thr Gln Glu Arg Asp Glu Ala Trp Val Val Gly Met Gly Ile Val Met				40			
				Gln Val			
TCT CTC ATC GTC CTG GCC ATC GTG TTT GGC AAT GTG CTG GTC ATC ACA GCC ATT GCC AAG				180			
Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys				60			
				T C G			
TTC GAG CGT CTG CAG ACG GTC ACC AAC TAC TTC ATC ACT TCA CTG GCC TGT GCT GAC TTA				240			
Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu				80			
				C	T		
GTC ATG GGC TTG GCA GTG GTG CCC TTT GGG GCC GCC CAT ATT CTC ATG AAA ATG TGG ACT					300		
Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys Met Trp Thr					100		
TTT GGC AAC TTC TGG TGC GAG TTT TGG ACT TOC ATT GAT GTG CTG TGC GTC ACG GCC AGC					360		
Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser					120		
					T		
ATT GAG ACC CTG TGC GTG ATC GCA GTG GAT GGC TAC TTT GGC ATT ACT TCA CCC TTC AAG					420		
Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys					140		
					C	T	
TAT CAG AGC CTG CTG ACC AAG AAT AAG GGC CCG GTG ATC ATT CTG ATG GTG TGG ATC GTG						480	
Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val						160	
TCA GGC CTT ACC TOC TTC TTG CCC ATT CAG ATG CAC TGG TAC CCG GCC ACC CAC CAG GAA						540	
Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala Thr His Gln Glu						180	
						T	T
GCC ATC AAC TGC TAC GCC AAG GAG ACC TGC TGT GAC TTC TTC ACG AAC CAA GCC TAT GCC							600
Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Thr Cys Cys Asp Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala							200
							Asn

☒ 3

<sup>T</sup>  
 ATT GCC TCC TCC ATC GTG TCC TTC TAC GTT CCC CTG GTG ATC ATG GTC TTC GTC TAC TCC 660  
 Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser 220

AGG GTC TTT CAG GAG GGC AAA AGG CAG CTC CAG AAG ATT GAC AAA TCT GAG GGC GGC TTC 720  
 Arg Val Phe Gln Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe 240

<sup>T</sup> <sup>G</sup>  
 CAT GCC CAG AAC CTT AGC CAG GTG GAG CAG GAT GGG GGG ACA GGG CAT GGA CTC GGC AGA 780  
 His Ala Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His Gly Leu Arg Arg 260  
 Val

<sup>G</sup>  
 TCT TCC AAG TTC TAC TTG AAG GAG CAC AAA GGC CTC AAG AGG TTA GGC ATC ATC ATG GGC 840  
 Ser Ser Lys Phe Tyr Leu Lys Glu His Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly 280  
 Cys

ACT TTC ACC CTC TGC TGG CTG CCC TTC TTC ATC GTT AAC ATT GTG CAT GTG ATC CAG GAT 900  
 Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp 300

<sup>G</sup> <sup>A A</sup> <sup>G</sup>  
 AAC CTC ATC CCT AAG GAA GTT TAC ATC CTC CTA AAT TGG GTG GGC TAT GTC AAT TCT GCT 960  
 Asn Leu Ile Pro Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Val Gly Tyr Val Asn Ser Ala 320  
 Arg Ile Gly

TTC AAT CCC CTT ATC TAC TGC GGG AGC CCA GAT TTC AGG ATT GGC TTC CAG GAG CTT CTG 1020  
 Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe Gln Glu Leu Leu 340

<sup>C</sup> <sup>A</sup> ... ..  
 TGT CTG GGC AGG TCT TCT TTG AAG GGC TGT GGG AAT GGC TAC TCC AGC AAC AGC AAT GGC 1080  
 Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Cys Gly Asn Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Asn Gly 360  
 Tyr

<sup>G</sup> ... ..  
 AAC ACA GGC GAG CAG AGT GGA TAT CAC CTG GAA CAG GAG AAA GAA AAT AAA CTG CTG TGT 1140  
 Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Tyr His Leu Glu Gln Glu Lys Glu Asn Lys Leu Leu Cys 380  
 Val

GAA GAC CTC CCA GGC AGC GAA GAC TTT GTG GGC CAT CAA GGT ACT GTG CCT AGC GAT AAC 1200  
 Glu Asp Leu Pro Gly Thr Glu Asp Phe Val Gly His Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Asn 400

<sup>A</sup> <sup>A</sup>  
 ATT GAT TCA CCA GGG AGG AGT TGT AGT ACA AAT GAC TCA CTG CTG TAAAGCAGTTTTTCTACTTT 1265  
 Ile Asp Ser Pro Gly Arg Ser Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu 415  
 Gln Asn

<sup>A</sup> <sup>C</sup> <sup>CCC</sup>  
 TTAAGACCAACCCC...CCAACAGAACTAAACAGAC 1300

図 4

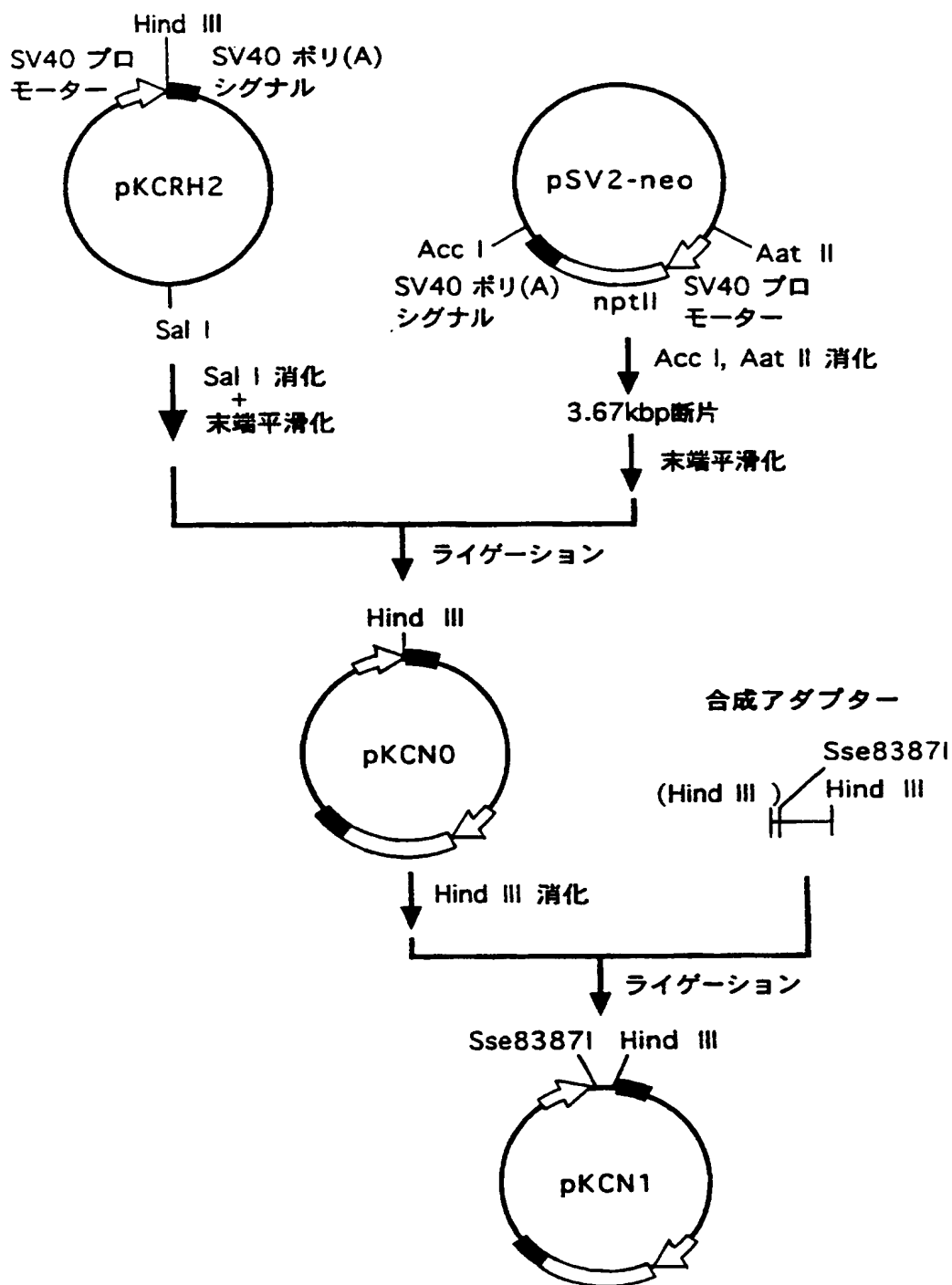




図 5

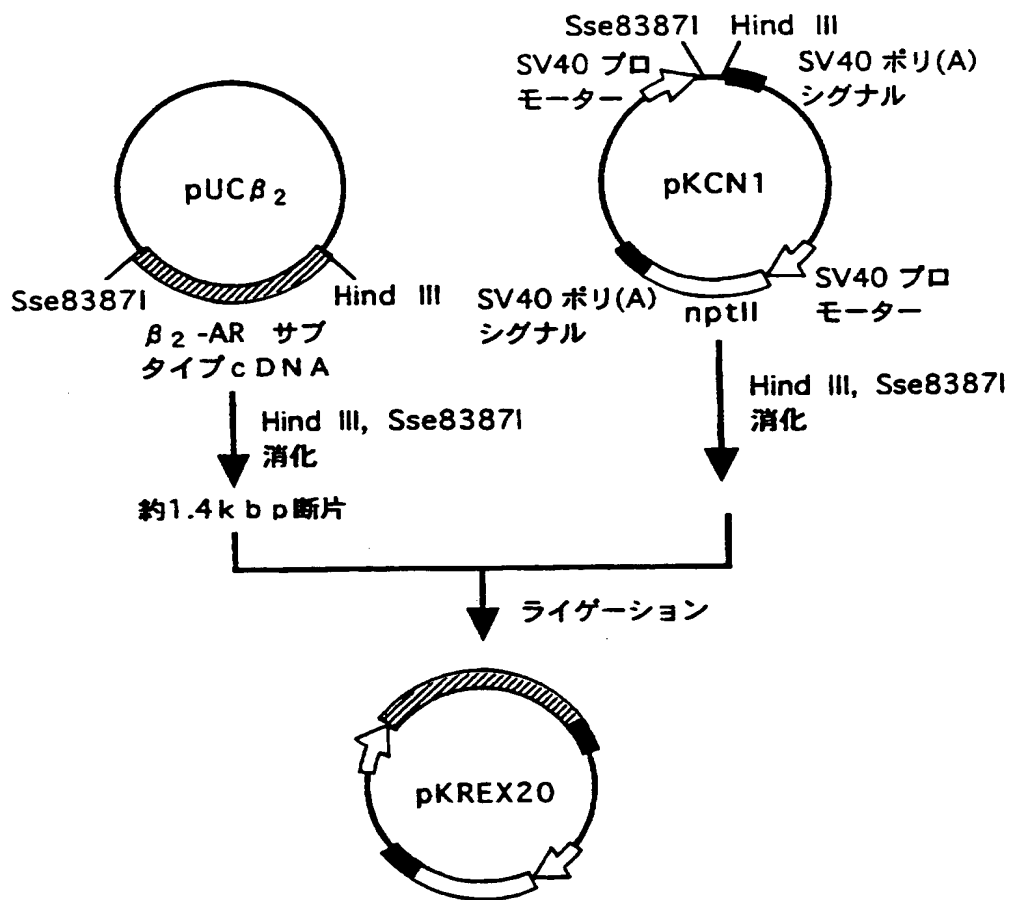


図 6

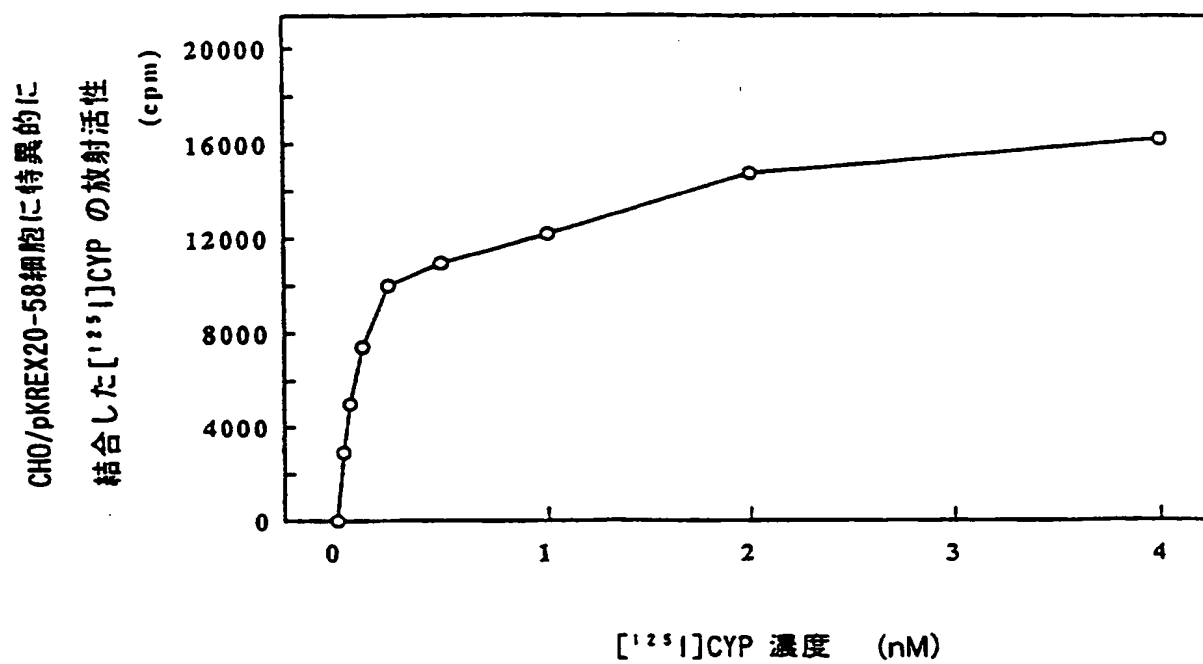


図 7

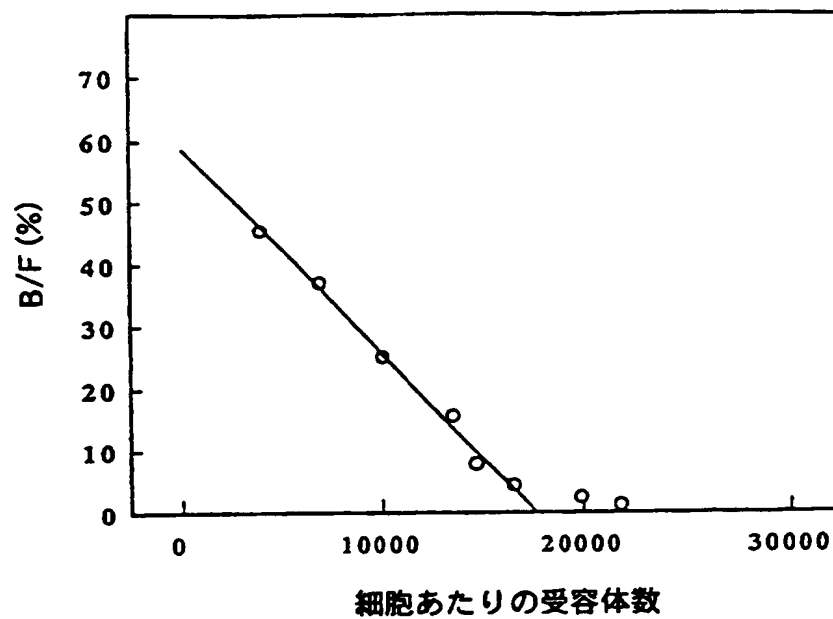


図 8

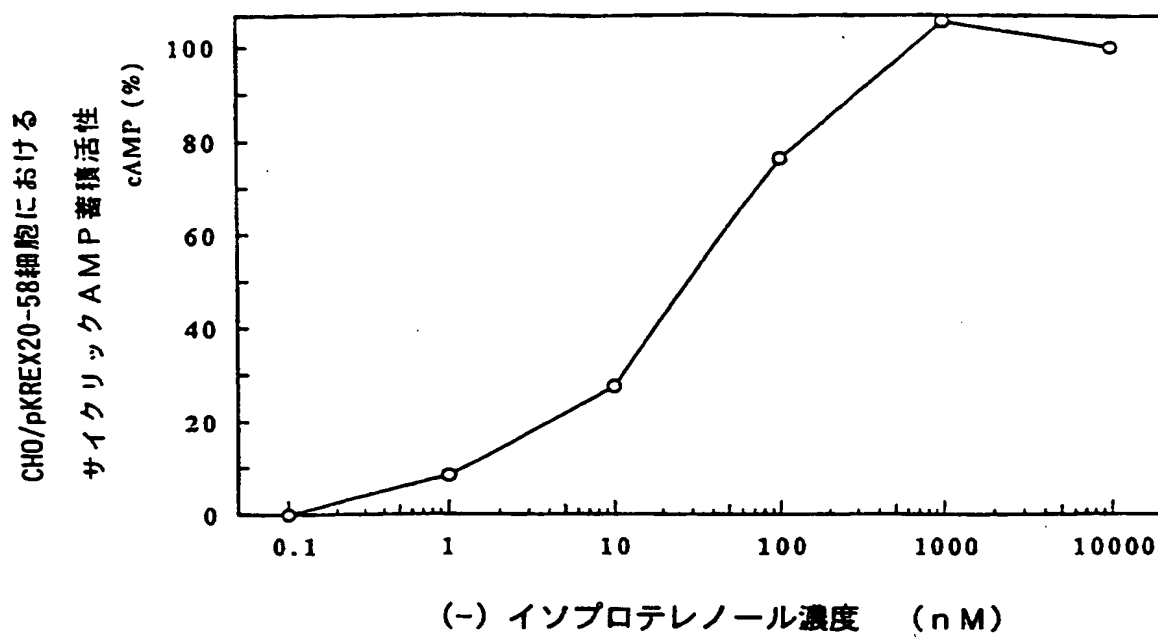
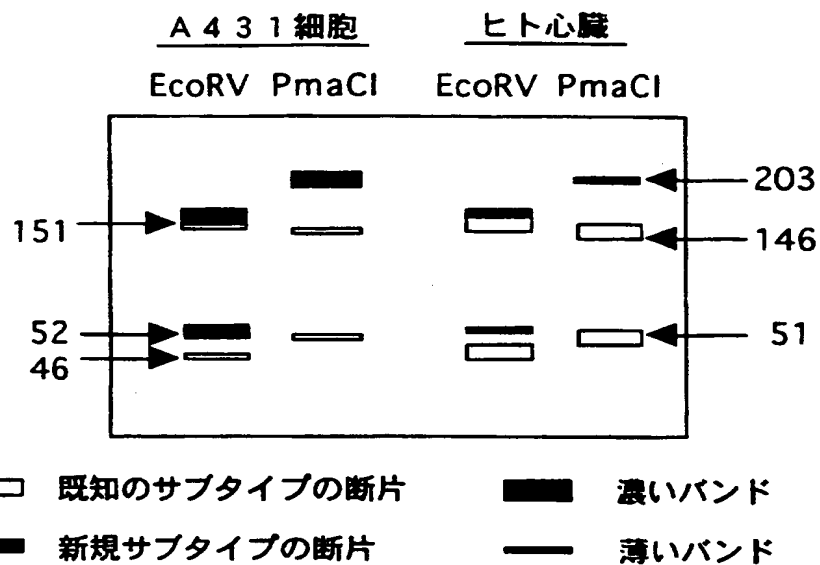
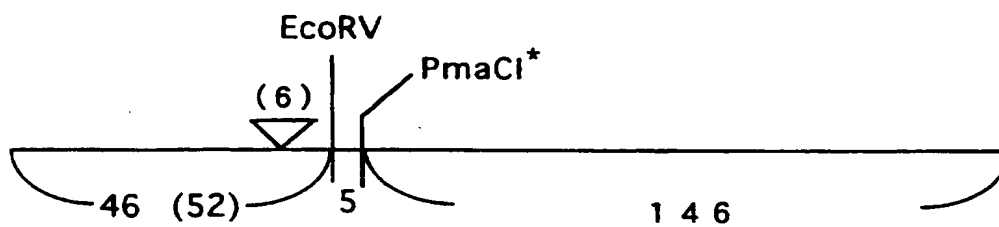


図 9

(a)



(b)



\* 新規サブタイプ由来の断片では消失している

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00982

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, WPI, GENETYX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L.J. Emorine et al. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" Vol. 84 (1987) pages 6995 to 6999	1 - 16
Y	Kobilka et al. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" Vol. 84 (1987) pages 46 to 50	1 - 16
Y	M. Rattray et al. "Molecular Brain Research" Vol. 7 (1990) pages 249 to 259	6 - 9
A	B. Feve et al. "The Journal of Biological Chemistry" (1991) Vol. 26, pages 20329 to 20336	1 - 16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 29, 1997 (29. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 10, 1997 (10. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>9</sup>: C12N15/00,

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>9</sup>: C12N15/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, WPI, GENETYX

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	L. J. EMORINE et. al 「PROC. NATL. ACD. SCI. USA」 第84巻(1987) 6995-6999頁	1-16
Y	KOBILKA et. al 「PROC. NATL. ACD. SCI. USA」 第84巻(1987) 46-50頁	1-16
Y	M. RATTRAY et. al 「MOLECULAR BRAIN RESEARCH」 第7巻(1990) 249-259頁	6-9
A	B. FEVE et. al 「THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY」 (1991) 第266巻、20329-20336頁	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.05.97

国際調査報告の発送日

10.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便 号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節



4B

8515

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**